

电击信号应激对大鼠体液免疫及内分泌功能的影响*

邵 枫 林文娟** 王玮雯 郑 丽

(中国科学院心理研究所脑-行为研究中心, 北京 100101)

摘 要 研究了足电击及以电击装置为信号刺激所诱发的的情绪应激对大鼠原发性体液免疫反应及内分泌的影响。结果表明每天 10 分钟, 共 6 天的足电击对大鼠抗特异性抗原 OVA 的原发性体液免疫反应无明显作用, 而此电击作用结合每天 10 分钟, 共 8 天的情绪应激则可显著降低大鼠体液免疫反应及脾脏指数。同时该应激可显著提高大鼠血儿茶酚胺和皮质酮水平。该研究证明了情绪应激对大鼠体液免疫功能的调节作用, 并对交感神经系统和下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴在其中所起的作用进行了初步探讨。

关键词 情绪应激, 原发性体液免疫反应, 儿茶酚胺, 皮质酮。

分类号 B845

1 前 言

近年来有关应激调节免疫系统功能的研究已越来越引起各国学者的重视。目前, 有关研究认为, 应激对免疫系统调节作用以抑制为主。例如, 动物实验表明, 束缚应激可导致大鼠胸腺退化和巨噬细胞活性下降; 噪音可降低小鼠淋巴细胞的细胞毒性作用^[1]。Lysle 等报道持续 64 分钟的足电击可降低大鼠自然杀伤细胞 (NK) 活性及淋巴细胞有丝分裂原反应^[2], 他们还发现, 电击装置诱发的条件反射性应激 (心理应激) 同样可抑制大鼠细胞免疫功能^[3]。我国学者李鸣等将应激源 (足电击) 的可控性作为心理因素, 研究了其对大鼠体液免疫功能的影响, 结果表明对应激源的不可控能降低大鼠体液免疫功能, 但在其研究过程中足电击与作为心理因素的可控性始终是结合在一起, 故无法分离出心理应激的体液免疫调节作用^[4]。目前国内外有关心理应激调节体液免疫功能的研究少有报道, 所以本实验采用了与足电击相分离的、以电击装置为信号刺激的情绪应激, 研究了其对大鼠抗特异性抗原 OVA 的抗体水平, 脾脏、胸腺指数, 外周血白细胞总数及血儿茶酚胺和皮质酮含量的影响, 旨在探讨该情绪应激对特异性原发体液免疫反应的影响及其可能的作用机制。

2 材 料 和 方 法

2.1 动物

40 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 250—300 克, 鼠龄 3 个月左右, 购于中国科学院遗传所动物中心。每只大鼠单笼喂养, 控制室温 ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) 和照明 (12 小时照明 / 12 小时黑暗, 每天早 7 点开始照明)。整个实验期间, 动物自由饮食 < 饮水, 饲料由北京市实验动物中心提供。

2.2 免疫

所有动物经 2 周适应期后, 于第 15 天 (第 0 天) 进行免疫。抗原是用卵清蛋白 (grade V ovalbumin, OVA; Sigma 公司产品) 溶于磷酸缓冲液 (PBS) ($\text{pH} = 7.3$), 再用等量的弗氏完全佐剂 (Gibco 公司产品) 乳化而成, 浓度为 $200\mu\text{g} / \text{ml}$, 每只大鼠腹腔注射 $100\mu\text{g} / 0.5\text{ml}$ OVA。

2.3 实验仪器

刺激电流由 SMI-1 型动物实验仪供给并调节, 电击箱为有机玻璃制成, 长宽高为 $30\text{cm} \times 30\text{cm} \times 30\text{cm}$ 。

2.4 实验程序

免疫后第二天开始给予应激刺激。足底电击给予的频率和强度是: 1.0mA , 持续时间 3 秒, 间隔时

收稿日期: 2000-06-17。

* 中国科学院重点基金和国家自然科学基金 (39830130) 以及中科院创新工程资助。

** 通讯作者: 林文娟。E-mail: linwj@psych.ac.cn

间 15 秒,共 33 次,总时间为 10 分钟。所有动物分成 4 组:电击组(S),电击 + 情绪应激组(ES),装置对照组 1(A1)和装置对照组 2(A2)。S 组动物免疫后 2 周内无规律给予 10 分钟 / 天,共 6 天的足电击,其余时间内无处置;ES 组动物在给予 S 组动物电击的当天亦接受同样强度和频率的足电击,而在 2 周内的其余时间仍将其每天置于电击装置内 10 分钟而

无电击(恐惧的情绪应激);A1 组动物仅在给予 S 组动物电击的当天被置于电击装置中 10 分钟而无电击;A2 组动物则每天被置于电击装置中 10 分钟而无电击,见表 1。实验在每天 08:00 至 16:00 间进行,各组动物被交替置于电击装置中,以排除激素分泌的昼夜节律变化对实验的影响。

2.5 指标测定

表1 实验程序

组别	0天	1,2天	3,4天	5天	6,7天	8,9天	10天	11天	12,13天	14天
电击组	OVA	电击		电击		电击		电击		
电击+情绪组	OVA	电击	装置	电击	装置	电击	装置	电击	装置	装置
装置对照组1	OVA	装置		装置		装置		装置		
装置对照组2	OVA	装置	装置	装置	装置	装置	装置	装置	装置	装置

注:OVA: OVA注射; 电击: 给予电击刺激; 装置: 将动物置于电击装置内,而无电击。

免疫后第 14 天,S 和 A1 组动物在安静状态下,ES 和 A2 组动物则分别被置于电击装置中 10 分钟而无电击后立即断头取血、胸腺、脾脏。其中血清抗 OVA IgG 抗体测定采用标准酶联免疫吸附法(ELISA),酶标仪为美国 BIO-RAD 公司产品(基本步骤如下:①用浓度为 1mg/ml 的 OVA 包被 96 孔板,在 4℃ 下过夜,用含 0.05%Tween20 的 PBS 洗板 2 次,双蒸水洗 1 次;②用含 0.005μl Tween20/ml 的 1%BSA 即牛血清白蛋白在室温下封闭 1 小时,洗板同上;③将稀释度为 1:100 的待测血清及 BSA 加入 96 孔板中,100μl / 孔,室温下放置 1 小时,洗板同上;④用 BIO-RAD 公司生产的过氧化物酶标记的羊抗-鼠 IgG 在室温下包被 1 小时,50μl / 孔,洗板同上;⑤将底物加入 96 孔板中,100μl / 孔,室温下放置 5 分钟,直到颜色充分显现;⑥用 2N 硫酸终止反应,50μl / 孔;⑦在酶标仪上读吸光度 OD 值);血清皮质酮测定采用免疫放射分析法,测试药盒为美国 DPC 公司生产的 I¹²⁵ 标记的大鼠皮质酮专用药盒 COAT-A-COUNT,仪器为 GC-911-γ 放射免疫计数器;血浆儿茶酚胺测定采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography HPLC)分析法,仪器为日本岛津 10A 系列高效液相色谱仪;外周血白细胞总数测定应用 JXJ-6 白细胞分类计数器在显微镜下计数;脾脏、胸腺指数为脾、胸腺重量与体重之比值。

如图 1 所示,与 A1 组动物相比较,S 组动物抗 OVA IgG 抗体 OD 值呈降低趋势但无显著性差异(P > 0.05, t-test);ES 组 OD 值较 S 组降低但无显著性差异(P > 0.05),而 ES 组动物 OD 值较 A2 组动物显著降低(P < 0.05)。ES 组动物的脾脏指数(脾脏指数以公式:脾重 mg / 体重 g 计算)显著低于 A2 组动物(P < 0.05),其余组间无显著差异(P > 0.05)(见图 2)。这说明情绪应激加电击对体液免疫功能有抑制作用。

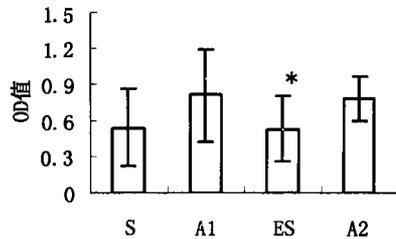


图1 电击和情绪应激对抗体水平(M±SD)的影响
注:S: 电击组;ES: 电击+情绪应激组;A1: 装置对照组1; A2: 装置对照组2。OD值: 吸光度(490nm)。*P<0.05,与装置对照组2相比较。下同。

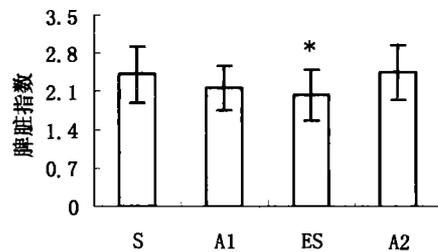


图2 电击和情绪应激对脾脏指数(M±SD)的影响

3 结 果

3.1 电击和情绪应激对大鼠原发性体液免疫反应和脾脏指数的影响

3.2 电击和情绪应激对大鼠外周血白细胞总数及胸腺指数的影响

各组间外周血白细胞总数(单位为个/mm³)及胸腺指数(胸腺指数以公式:胸腺重量 mg/ 体重 g 计算)比较均无显著性差异(P>0.05, t-test),但 ES 组均最低(见图 3 和 4)。

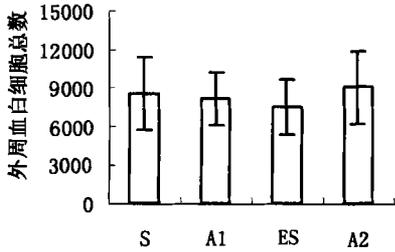


图3 电击和情绪应激对外周血白细胞总数(M±SD)的影响

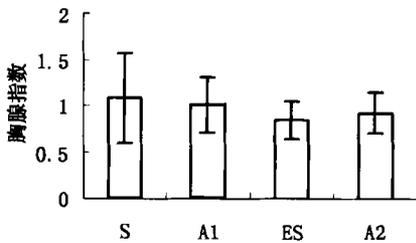


图4 电击和情绪应激对胸腺指数(M±SD)的影响

3.3 情绪应激对大鼠血儿茶酚胺和皮质酮水平的影响

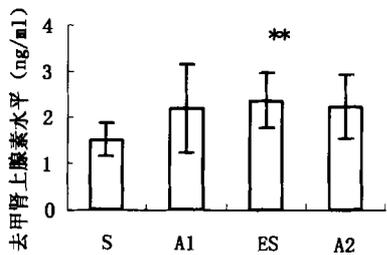


图5 电击和情绪应激对去甲肾上腺素水平(M±SD)的影响
注: ** P<0.01, 与安静状态下S组动物相比较。

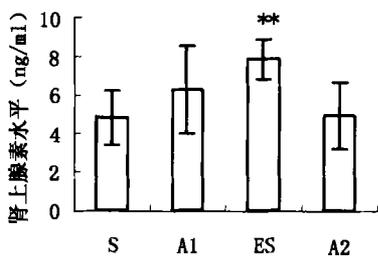


图6 电击和情绪应激对肾上腺素水平(M±SD)的影响
注 ** P<0.01, 与安静状态下S组动物及A2组动物相比较。

与安静状态下 S 组动物相比较, ES 组动物去甲肾上腺素、肾上腺素及皮质酮水平均显著提高(P < 0.01, t-test), 且 ES 组动物肾上腺素水平亦较 A2 组

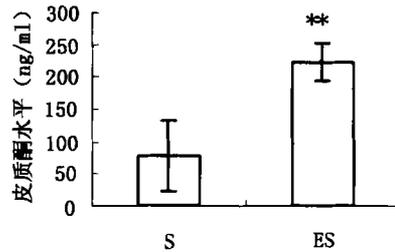


图7 电击和情绪应激对皮质酮含量(M±SD)的影响
注: ** P<0.01, 与安静状态下S组动物相比较。

显著提高(P < 0.01) (见图 5—7), 这表明电击装置作为信号刺激可诱发动物的情绪应激。

4 讨 论

4.1 应激对免疫功能的调节作用

自 1957 年 Marsh 和 Brill 发现应激性刺激可提高小鼠对单纯疱疹病毒的易感性以来^[5], 大量动物实验已证实了应激的免疫调节作用。例如, Moynihan JA 等研究表明, 首次免疫后 24 小时给予小鼠单独一次足电击可导致其继发性抗 KLH IgG 反应降低^[6]; Zalcman S 等证实足电击可降低 CD-1 小鼠对绵羊红细胞 (SRBC) 的 PFC 反应^[7]; 同样 Okimura 和 Nigo 所完成的一系列实验亦表明 SRBC 免疫前 2 天给予束缚应激可使 PFC 反应下降 30%—60%^[8]。还有的研究者测量了一系列不同强度环境应激对细胞免疫参数的作用, 结果证实非常温和 / 或非常强烈的刺激均对细胞免疫应答产生抑制作用^[2]。尽管上述研究结果证实了应激的免疫抑制作用, 但它们观察的多是物理应激对细胞和体液免疫应答的作用, 而有关心理应激与免疫系统间的关系鲜有报道。国内常青等研究认为以恐惧、焦虑为特征的条件反射性应激可以抑制大鼠的细胞免疫功能*。本实验研究了足电击和以电击装置为信号刺激诱发的情绪应激对特异性原发体液免疫反应的影响, 结果表明单纯电击和单纯心理应激均对大鼠抗特异性抗原 OVA 的原发性体液免疫反应有一定的抑制作用, 但无显著性改变; 而电击 + 情绪应激则可显著降低此免疫应答反应, 且胸腺指数和白细胞总数亦呈降低趋势。实验结果提示电击和情绪应激均对特异性原发体液免疫反应具有一定的抑制作

*常青. 杏仁中央核在应激导致的大鼠细胞免疫及内分泌改变中的中介作用研究. 北京大学心理学系, 博士学位论文, 1998

用。这一结果部分符合 Croiset G 等的研究,他们的研究表明足电击可增强大鼠体内、外免疫应答,此结果与我们的研究结果相反,但其实验大鼠在足电击训练后,被施加情绪应激时,则原来增高的免疫系统反应降低至对照组水平,这与我们的研究结果一致,同样证明了情绪应激的免疫抑制作用^[9]。

4.2 HPA 轴、交感神经系统与应激免疫抑制作用的关系

早在本世纪初, Selye 和 Cannon 已发现了应激可激活肾上腺皮质和髓质而分泌糖皮质激素和儿茶酚胺。近年来国内外研究表明,应激引起的上述内分泌改变,即下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴和交感神经系统激活与应激的免疫抑制作用相关。目前认为糖皮质激素可能通过与淋巴细胞胞浆内皮质醇受体相结合而直接对淋巴细胞起作用,使淋巴细胞数目减少,NK 细胞活性降低^[1]。Tarcic N 等指出内源性糖皮质激素对束缚应激所诱发的胸腺退化和萎缩发挥特异性作用^[10];而 Rey AD 等研究提示小鼠内源性糖皮质激素水平可控制 B 细胞活性并参与 B 细胞与其它免疫细胞间的相互作用^[11]。同时研究还证实,所有淋巴器官和组织包括胸腺、骨髓、脾、淋巴结上均存在直接的交感神经支配^[12],且放射配体结合研究已确定了免疫细胞上 α 和 β 肾上腺素能受体结合位点的存在^[13],因此应激过程中激活的交感神经系统释放的儿茶酚胺类物质可直接作用于免疫细胞或通过直接的神经纤维支配而影响免疫功能。本实验证明情绪应激可显著提高大鼠血去甲肾上腺素、肾上腺素及皮质酮水平,且二者均与抗体值呈负相关趋势,但它们在应激免疫抑制中的确切作用尚不清楚,究竟是两者均参与应激的免疫抑制作用还是以一方为主还有待证实,在以后的研究中我们将对这一问题做进一步探讨。

致谢: 本实验使用的电击装置是由中国科学院心理研究所三室管林初老师提供的,管老师对此次实验给予了热情的帮助和指导,在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

1 McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, et al. The role of

adrenocorticoids as modulates of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interacts. *Brain Research Review*, 1997, 23:79—133

- 2 Lysle DT, Lyte M, Fowler H. Shock-induced modulation of lymphocyte reactivity suppression, Habituation, and recovery. *Life Science*, 1987, 41(15):1805—1814
- 3 Lysle DT, Cunnick JE, Fowler H. Pavlovian conditioning of shock-induced suppression of lymphocyte reactivity: acquisition, extinction, and preexposure effects. *Life Science*, 1988, 42:2185—2194
- 4 李鸣等. 应激源的可控性和可预测性对大鼠糖皮质激素及体液免疫的影响. *心理学报*, 1997, 29(增刊): 43—47
- 5 Ader R. Historical perspectives on psychoneuroimmunology. In: Friedman H, Klein TW, Friedman AL ed. *Psychoneuroimmunology, Stress, and Infection*. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, 1996. 1—24
- 6 Moynihan JA, Ader R, Grotta LJ, et al. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1990, 4:1—12
- 7 Zalcman S, Kerr L, Anisman H. Immunosuppression elicited by stressors and stressor-related odors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1992, 6:50—63
- 8 Okimura T, Nigo Y. Stress and immune responses I: Suppression of T cells function in restraint-stressed mice. *Japan J Pharmacology*, 1986, 40:505—511
- 9 Croiset G, Heijnen CJ, Veldhuis HD, et al. Modulation of the immune response by emotional stress. *Life Science*, 1987, 40(8):775—782
- 10 Tarcic N, Ovadia H, Weiss DW, et al. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*, 1998, 82:40—46
- 11 Rey AD, Besedovsky, Sorkin E. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice. *Journal of Immunology*, 1984, 133(2): 572—575
- 12 Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunology Review*, 1987, 100: 225—260
- 13 Mills PJ, Dimsdale JE. The promise of adrenergic receptors studies in psychophysilogic research II: applications, limitations, and progress. *Psychosomatic Medicine*, 1993, 55: 448—457

MODULATION OF THE PRIMARY HUMORAL IMMUNITY BY EMOTIONAL STRESS

Shao Feng Lin Wenjuan Wang Weiwen Zheng Li
(*Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*)

Abstract

The emotional stress induced by footshock apparatus as signal stimuli was investigated for its effect on the primary humoral immunity and endocrine response of rats. The reactivity of primary humoral immunity was tested by determining the value of specific IgG antibody after immunization with OVA, and the value of catecholamine and corticosterone were used to measure the endocrine response. Our results showed that ten minutes per day, six days uncontrolled footshocks could not decrease significantly the primary humoral immune response of rats, but footshocks and emotional stress together could decrease the anti-OVA IgG antibody production and spleen index significantly. At the same time, emotional stress could increase the levels of catecholamine and corticosterone significantly. It was concluded that immune and endocrine system were capable of reacting specifically to psychological stimuli.

Key words emotional stress, primary humoral immunity, catecholamine, corticosterone.